

## 赤点石斑鱼微卫星 DNA 的筛选

林能锋<sup>1,2</sup>, 苏永全<sup>1</sup>, 丁少雄<sup>1</sup>, 王 军<sup>1</sup>

(1. 厦门大学海洋与环境学院海洋学系, 福建 厦门 361005;

2. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

**摘 要:** 提取赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 基因组 DNA, 经 BamH I 和 Hind III 双酶切并电泳回收 300~1 000 bp 的片段与经 BamH I 和 Hind III 双酶切的 pUC18 质粒重组, 转化感受态大肠杆菌 JM109, 以 互补法筛选重组阳性克隆, 建立赤点石斑鱼部分基因组文库。应用 PCR 混合池法筛选含核心序列为 (CA)<sub>n</sub> 和 (GA)<sub>n</sub> 微卫星位点的阳性克隆, 经 DNA 测序, 得到 61 个含微卫星序列的克隆, 占总克隆数的 2.89%。61 个用于测序的克隆中共有 111 个不同类型的微卫星序列, 其中 (CA/TG)<sub>n</sub> 重复类型 57 个, 占 51.4%; (AG/TC)<sub>n</sub> 重复类型 35 个, 占 31.5%; 其他重复类型 19 个, 占 17.1%。完美型、非完美型及复合型序列分别占 48.7%、41.4% 和 9.9%。并在 GenBank 上注册了 22 个微卫星序列。

**关键词:** 赤点石斑鱼; 微卫星; PCR 混合池法**中图分类号:** Q 959.4**文献标识码:** A**Isolation of microsatellite DNA in *Epinephelus akaara***LIN Neng-feng<sup>1,2</sup>, SU Yong-quan<sup>1</sup>, DING Shao-xiong<sup>1</sup>, WANG Jun<sup>1</sup>

(1. Department of Oceanography, College of Oceanography and Environmental Science, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; 2. Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agriculture Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

**Abstract:** A partial genomic library of *Epinephelus akaara* was constructed and a PCR-based strategy was developed to screen the microsatellites in the library. A total of 2112 recombinant colonies were picked and regrown overnight in 96-well cell culture plates with 100  $\mu$ L of LB medium plus ampicillin each well at 37 °C. Twenty two plates were obtained and there were 20 mixing-pools in each plate. A PCR-based screening library method was used to screen these mixing-pools via the universal primer of M13 and repeat motif primers (CA)<sub>n</sub>C and (GA)<sub>n</sub>G, respectively. There were 111 microsatellites isolated after 61 positive clones were sequenced. The results indicated that microsatellite sequences characterized by (AC/GT)<sub>n</sub> and (GA/CT)<sub>n</sub> were abundant in genomic DNA of *Epinephelus akaara*. A portion of microsatellites repeat motifs and their flanking sequences were described. Among the 111 microsatellites, there were 54 perfect ones (48.7%), 46 imperfect ones (41.4%), and 11 compound ones (9.9%). The 22 microsatellites sequences were submitted to the GenBank. It is supposed that these loci could be used for further genetic diversity and population structure analysis of *Epinephelus akaara*.

**Key words:** *Epinephelus akaara*; microsatellite; PCR; mixing-pool

赤点石斑鱼 (*Epinephelus akaara*) 隶属鲈形目 (Perciformes), 鮨科 (Serranidae), 其肉质鲜美, 营养丰富, 是名贵的海产经济鱼类, 主要分布于日本、朝鲜、印度和我国东南沿海<sup>[1-2]</sup>。

石斑鱼因种类繁多、分布广泛、体色易受生境影响而发生变异以及可能存在种间杂交等因素, 不仅导致石斑鱼系统分类的难度较大, 也给养殖生产

中种苗和亲本的引进、鉴定带来了困难<sup>[3]</sup>。随着石斑鱼野生资源量的日渐萎缩和人工养殖业的不断发展, 为避免出现种质混杂和退化, 石斑鱼的种质资源保护和遗传改良研究已刻不容缓。

微卫星 DNA 均匀分布于基因组中, 它具有多态性丰富、遵循孟德尔分离定律、共显性遗传、易于 PCR 扩增等特点, 目前已广泛应用水产动物种

收稿日期: 2007-03-29 初稿; 2007-05-10 修改稿

作者简介: 林能锋 (1972-), 男, 博士研究生, 从事海洋鱼类种质资源与遗传育种研究 (E-mail: lnfeng@hotmail.com)。

通讯作者: 王军 (1953-), 女, 教授, 主要从事海洋鱼类种质资源与遗传育种研究 (E-mail: junw@xmu.edu.cn)。

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40306023, 40576064); 中国高新技术研究计划 (2001AA621010)

质鉴定、家系分析、基因连锁定位、遗传图谱构建及遗传育种等许多研究领域<sup>[4-5]</sup>。做为一种高效的遗传分析工具,微卫星标记可对赤点石斑鱼的种群遗传学及种质改良等研究提供较为丰富的遗传基础信息。

微卫星位点可以通过直接杂交筛选小片段基因组文库或是通过建立微卫星富集文库、筛选、测序等方法获得,也可以间接通过检索 GenBank 等数据库或参考近缘物种已知微卫星序列等方法获得。本文通过构建赤点石斑鱼小片段基因组文库并应用距阵 PCR 反应池法获得了较好的筛选效果。

## 1 材料与方法

### 1.1 构建赤点石斑鱼小片段基因组文库

赤点石斑鱼购自厦门农贸市场,取背部肌肉,用常规酚-氯仿-异戊醇法<sup>[6]</sup>提取基因组 DNA,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的质量,核酸检测仪测定所得 DNA 含量,调整定量至  $200 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

取  $10 \mu\text{g}$  基因组 DNA 经 BamH I 和 Hind III 双酶切,1%琼脂糖凝胶电泳,切下含 300~1 000 bp 酶切片段的琼脂糖胶块,用 DNA 纯化通用试剂盒回收酶切片段,与经 BamH I 和 Hind III 双酶切的 pUC18 质粒连接,转入大肠杆菌 JM109 感受态细胞,以互补法筛选重组阳性克隆<sup>[6]</sup>。用无菌牙签挑取分隔良好白色单菌落接种于含氨苄青霉素的 LB 培养基(无菌的 96 孔细胞培养板),37℃、150

$\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$  振荡培养过夜,加 15%甘油, -80℃ 保存。

### 1.2 筛选含微卫星的阳性克隆

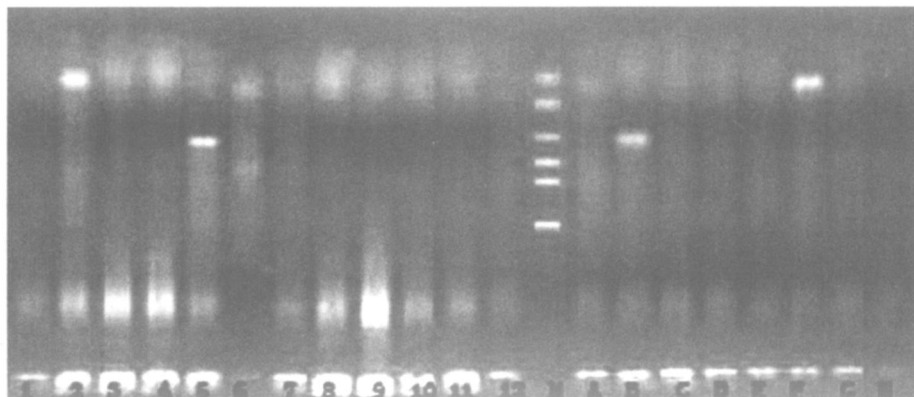
1.2.1 用于 PCR 法筛选的引物 M13 (-20): 5' GTAAAACGACGGCAGT3', M13 (RV): 5' CAGGAAACAGCTATGAC3' 为分别来自 pUC18 质粒多克隆位点两侧的通用引物。

微卫星核心序列引物 MC1: 5' (CA)<sub>7</sub>C 3', MC2: 5' (GA)<sub>7</sub>G 3'。

以上引物均由上海 invitrogen 公司合成。

1.2.2 矩阵 PCR 筛选微卫星文库 每块 96 孔板的 A-H 行的各孔分别取 5  $\mu\text{L}$  菌液混合组成 8 个“行池”,1~12 列的各孔各取 5  $\mu\text{L}$  混合组成 12 个“列池”。每板共形成 20 个混合模板池。

用 1.2.1 所述 4 条引物分别组合进行扩增,即 M13 (-20) / MC1, M13 (RV) / MC1, M13 (-20) / MC2, M13 (RV) / MC2。PCR 反应体系为:模板菌液(为通过矩阵排列混合) 1.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP 200  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  1.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , Taq DNA 聚合酶 0.75 U, 反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件为: 94℃ 4 min, 94℃ 45 s, 46℃ 45 s, 72℃ 45 s, 30 个循环, 72℃ 延伸 10 min。1.0%琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果。将各行、列的 PCR 反应中长度相同的阳性扩增条带判定为同一个克隆的扩增产物,根据结果进行交叉定位,确定微卫星阳性克隆孔(图 1)。



1~12 为列池的 PCR 扩增结果; A~H 为行池的 PCR 扩增结果, M 为 DL2 000 分子量标准。本图中微卫星阳性克隆为 B5 孔与 F2 孔。

图 1 微卫星阳性克隆的筛选

Fig. 1 PCR-based screening of microsatellite positive clones

### 1.3 选择用于测序的阳性克隆

用 M13 (-20) / M13 (RV) 引物对 1.2.2 结果中的阳性克隆进行 PCR 扩增,确定插入片段的

大小,以插入片段的长度减去 M13 (-20) 或 M13 (RV) 引物与核心序列的扩增产物长度再减去所扩增的载体部分序列即为侧翼序列长度,挑选

侧翼序列长度大于 100 bp 的克隆送上海 invitrogen 公司测序。

1. 4 微卫星序列的识别和分类

利用 SSRHunter 软件结合人工识别搜索测序结果中的微卫星序列。根据 Weber<sup>[7]</sup> 提出的分类标准对所获得的微卫星序列进行分类。

2 结果与分析

2. 1 赤点石斑鱼部分基因组文库中含微卫星的阳性克隆

实验共得到 2 112 个重组阳性克隆，保存于 22 块 96 孔细胞培养板。混合后得到 22 组共 440 个模板菌液的混合池。筛选后获得含微卫星的阳性克隆 88 个，占重组阳性克隆的 4. 17 %。

2. 2 含微卫星阳性克隆的测序结果

按 1. 3 方法选择后进行测序的克隆共 75 个，平均插入片段长度约 530 bp，其中 61 个克隆含微

卫星序列（占总克隆数的 2. 89 %），经软件与人工识别相结合，共得到微卫星 DNA 序列 111 个。其中 (CA/ GT) n 57 个，(GA/ CT) n 35 个，(T) n 8 个，(AT) n 5 个，(CTG) n 3 个，(CAC) n 1 个，(CGCA) n 1 个，(C) n 1 个。根据 Weber<sup>[7]</sup> 提出的分类标准，对所获得 111 个微卫星序列分类结果见表 1。表 2 列出了部分微卫星序列的核心重复单元及其旁侧序列。

表 1 赤点石斑鱼不同类型微卫星序列的数目及所占比例  
Table 1 Ratio of three types of microsatellite of Epinephelus akaara

分离到微卫星总数		111		
微卫星类型	完美型	非完美型	复合型	
数目及比例	54 (48. 7 %)	46 (41. 4 %)	11 (9. 9 %)	

表 2 赤点石斑鱼部分微卫星 DNA 的核心序列及旁侧序列  
Table 2 Part of microsatellites repeat motifs and 5 and 3 flanking sequences of Epinephelus akaara

位点	5 旁侧序列	核心重复单元	3 旁侧序列	GenBank 序列号
EA1C8	CCA GGCACCT	(CT) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> (CT) <sub>10</sub>	GTATCCTATT	EF504227
EA1E7	TGTCCTGCAT	(CT) <sub>2</sub> G(TC) <sub>5</sub> (TG) <sub>2</sub> (TC) <sub>2</sub> TG(TC) <sub>5</sub> TG(TC) <sub>4</sub>	TTTCTGTCTC	EF504228
EA2G3	GAACTTTGAC	(TG) <sub>5</sub> (TC) <sub>6</sub> TG(TC) <sub>6</sub>	GTCGAGTAAA	EF504230
EA4A10	TTTGCA GTAG	(GT) <sub>22</sub> (GA) <sub>9</sub>	CTGCGAAAGC	EF504233
EA5F3	ATATTA TG TG	(CA) <sub>19</sub>	CTGCGAAAGC	EF504233
EA5H6	CTGTCCTGCA	(AC) <sub>2</sub> A <sub>2</sub> (AC) <sub>2</sub> A <sub>2</sub> (AC) <sub>6</sub> A <sub>2</sub> (AC) <sub>2</sub> A <sub>2</sub> (AC) <sub>11</sub> A <sub>2</sub> AC	GATGCACATG	EF504234
EA6B9	ACCGGGCACC	(TC) <sub>4</sub> TG(TC) <sub>2</sub> TG(TC) <sub>5</sub> TG(TC) <sub>5</sub>	TTACTGTCTC	EF504235
EA6E10	GGTGTCTTT	(CT) <sub>13</sub> T <sub>2</sub> (CT) <sub>9</sub>	CATTGTGTCA	EF504236
EA8F10	CCCCCTCTAC	(TA) <sub>3</sub> GA(TA) <sub>3</sub> GA(TA) <sub>3</sub> CA(TA) <sub>2</sub> CA(TG) <sub>35</sub>	TCATTTTCA	EF504237
EA9B8	TTTGTTGGA	(CAC) <sub>8</sub>	TCCCCAAACA	EF504239
EA10E11	AA GCCTGGGA	(GT) <sub>24</sub>	ACGCGCGTGC	EF504240
EA11B8	CCGGGCACCT	(TG) <sub>9</sub> (TATC) <sub>2</sub> (TATG) <sub>2</sub> (TG) <sub>10</sub>	CCAGTTCCCA	EF504241
EA11D1	CCGAGCACCT	(TC) <sub>6</sub> G(CT) <sub>2</sub> CG(CT) <sub>8</sub> C <sub>2</sub> (CT) <sub>5</sub>	CGTATCCTAT	EF504242
EA14B11	AA GTGACTTG	(TC) <sub>27</sub>	GCTAACACTC	EF504243
EA14C12	GGAGCCTGT	(CA) <sub>5</sub> (CGCA) <sub>5</sub> (CA) <sub>18</sub>	CTCAATCACG	EF504244
EA20A2	ACACAGTACA	(CA) <sub>15</sub>	GACATACCA	EF504245
		(TG) <sub>30</sub>	GAGTTCACCT	EF504247

3 讨 论

3. 1 微卫星探针及筛选文库方法的选择

在动物基因组中微卫星大约 6 ~ 10 kb 出现 1 次<sup>[8- 9]</sup>，其中二碱基重复类型 (CA/ GT, AG/ TC, AT/ TA) 的微卫星最为常见，约占总微卫星数量

的 30 % ~ 67 %<sup>[5, 10]</sup>。鱼类微卫星中以 (CA / GT) n 的数量居多，本实验结果也显示，采用 2 种核心序列引物筛选出来的赤点石斑鱼微卫星序列中 (CA/ GT) n 类型多于 (AG/ TC) n 类型。在脊椎动物中，(AT) n 在基因组中的数量仅次于 (CA) n<sup>[11]</sup>，而在一些无脊椎动物，如中国明对虾 ( Fennero-

*penaeus chinensis*) 基因组中, (AT) $n$  重复类型的数量最大<sup>[12-13]</sup>。但较长的 (AT) $n$  容易形成二级结构而造成 PCR 效率下降, 以及在电泳分离中造成较大误差, 并会给测序工作带来一些麻烦。由于三碱基以上重复类型的微卫星序列在基因组中出现的次数要远少于二碱基重复类型。因此本研究只选用 (CA/GT) $n$ 、(AG/TC) $n$  2 种重复类型的微卫星核心序列。

徐鹏等<sup>[14]</sup>曾以 PCR 法筛选到 31 个中国对虾微卫星 DNA, 李霞等<sup>[15]</sup>用类似方法筛选到 24 个剑尾鱼的微卫星 DNA, 证明了 PCR 法筛选微卫星的可行性。但在进行较大规模微卫星位点筛选时, 如果对小片段基因组文库进行逐个克隆的筛选, 工作量较大, 为提高筛选效率, 常通过逐级混合克隆, 分步 PCR 的方法筛选阳性克隆, 此方法称做“反应池”方法<sup>[16]</sup>。本研究采用“行池”、“列池”混合单克隆, 再进行 20 个 PCR 扩增, 根据行、列的阳性结果进行交叉定位, 确定阳性克隆在 96 孔细胞板上的坐标; 再挑取含微卫星的阳性单克隆利用通用引物进行 PCR, 测得插入片段长度, 从而确定微卫星在插入片段中的位置, 筛选出微卫星序列两端有较长侧翼序列的克隆, 以利于随后进行的微卫星引物的设计。本研究所建立的小片段基因组文库的平均插入片段长度约 530 bp, 因此在一块 96 孔板上约有总长为 50 kb 的基因组序列, 按基因组中平均每 10~20 kb 出现 1 个二碱基重复类型的微卫星, 那么在一块板上只有 2~5 个二碱基重复类型的微卫星克隆, 因此在交叉定位时较易确定阳性孔的位置。采用“反应池”方案能大大减少筛选的工作量, 降低成本, 所得的筛选结果较为准确可靠。

尽管 PCR 方法较灵敏, 但经常会出现非特异带, 可以通过改善 PCR 条件, 如调节退火温度来减少非特异带的产生或通过第 2 轮阳性单克隆的确认以及提取重组质粒为模板等方法来排除一些影响 PCR 特异性扩增的因素。

### 3.2 微卫星在基因组中的分布频率及重复次数的变异

根据本研究结果的估算, (CA) $n$  重复类型的微卫星在赤点石斑鱼基因组中的出现频率约为每 14.2 kb 出现 1 次, 与三刺鱼 (*Gasterosteus aculeatus*) 的约每 14 kb 出现 1 次<sup>[17]</sup> 近似, 低于红鳍东方鲀 (*Fugu rubripes*) 的每 6.56 kb 出现 1 次 (CA) $n$  类型的微卫星<sup>[18]</sup>。

研究表明, 真核生物的微卫星核心单元的重复

次数大都在 30~40 次以下, Ellegren 认为, 微卫星长度的均衡分布可能是点突变与复制滑移相互间平衡作用的结果, 其中重复单元的随机突变 (如非完美型微卫星序列) 在不同物种重复单元长度变异控制上扮演重要的角色<sup>[19]</sup>。本研究出现的重复次数最多的完美型微卫星序列重复次数为 35 次。非完美型的微卫星序列大多是点突变的类型, 这些核心序列的突变所包含的种群进化中的遗传信息, 可做为进一步研究系统进化的证据<sup>[20]</sup>。

本研究所筛选出的赤点石斑鱼微卫星序列中已有 22 个在 GenBank 上注册。进一步分析这些序列的多态性, 可获得赤点石斑鱼种群遗传背景的相关信息, 为赤点石斑鱼的遗传育种和种质资源保护提供重要的参考资料。通过筛选出更多的微卫星多态性位点还可用于 QTL 基因的筛选与定位, 构建完整基因组连锁图谱, 为进行标记辅助育种 (marker-assisted selection, MAS) 奠定基础。此外, 由于微卫星侧翼序列具有一定的保守性, 可将本实验所获得的赤点石斑鱼微卫星 DNA 序列用于其他石斑鱼等近缘种的遗传背景分析。

### 参考文献:

- [1] 洪万树, 张其永. 赤点石斑鱼繁殖生物学及种苗培育研究概况 [J]. 海洋科学, 1994, (5): 17-19.
- [2] 王涵生. 石斑鱼 (*Epinephelus*) 人工繁殖研究的现状与存在问题 [J]. 大连水产学院学报, 1997, 12 (3): 44-51.
- [3] 丁少雄, 王颖汇, 王军, 等. 基于 16S rDNA 部分序列探讨中国近海 30 种石斑鱼类的分子系统进化关系 [J]. 动物学报, 2006, 52 (3): 504-513.
- [4] O'CONNELL M, WRIGHT J M. Microsatellite DNA in Fishes [J]. Fish Biology and Fisheries, 1997, (7): 331-363.
- [5] CHISTIA KO D A, HELLEMAN B, VOLCKAERT F A M. Microsatellites and their genomic distribution, evolution, function and applications: A review with special reference to fish genetics [J]. Aquaculture, 2006, 255: 1-29.
- [6] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A Laboratory Manual [M]. New York: Cold Spring Harbour Press, 1989: 463-468.
- [7] WEBER J L. Informativeness of Human (dT-dA) $n$ , (dG-dT) $n$  polymorphisms [J]. Genomics, 1990, (7): 524-530.
- [8] WANG Z, WEBER J L, ZHANG G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeat [J]. The Applied Genetics, 1994, 88: 1-6.
- [9] WRIGHT J M. DNA fingerprinting in fishes [M] // Hochachka P W, Mommsen T. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes. Elsevier, Amsterdam, 1993: 58-91.
- [10] BRENNER S, ELGAR G, SANDFORD R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. Nature, 1993, 366: 256-259.

- [11] TothTOTH G, GASPARI Z, JURKA J. Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis [J]. *Genome Res*, 2000, 10: 967 - 981.
- [12] 孔杰, 高焕. 中国明对虾基因组串联重复序列分析 [J]. *科学通报*, 2005, 50 (13): 1340 - 1347.
- [13] 高焕, 刘萍, 孟宪红, 等. 中国对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 基因组微卫星特征分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2004, 35 (5): 424 - 431.
- [14] 徐鹏, 周岭华, 相建海. 用 PCR 法快速筛选中国对虾含微卫星的重组阳性克隆 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (2): 127 - 130.
- [15] 李霞, 白俊杰, 吴淑勤, 等. 剑尾鱼微卫星 DNA 的筛选 [J]. *中国水产科学*, 2004, 11 (3): 196 - 201.
- [16] 胡松年, 薛庆中. 基因组数据分析手册 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2003: 8 - 9.
- [17] PEICHEL L, NERENG K S, OHGI K A, et al. The genetic architecture of divergence between threespine stickleback species [J]. *Nature*, 2001, 414: 901 - 915.
- [18] EDWARDS YJ, ELA GAR G, CLARK M S, et al. The identification and characterization of microsatellites in the compact genome of the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*: perspectives in functional and comparative genomic analysis [J]. *J Mol Biol*, 1998, 278: 843 - 854.
- [19] ELLEGREN H. Microsatellite evolution: a battle between replication slippage and point mutation [J]. *Trends Genet*, 2002, 18: 70.
- [20] ZHU Y, QUELLER D C, STRASSMANN J E. A Phylogenetic Perspective on Sequence Evolution in Microsatellite Loci [J]. *J Mol Evol*, 2000, 50: 324 - 338.

(责任编辑: 翁志辉)

www.cnki.net